



UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE
MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA



Infectividad y efectividad de rizobios en
***Lablab purpureus* (L.) Sweet “Frijol chileno”**

TESIS

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN
BIOLOGÍA MICROBIOLOGÍA - PARASITOLOGÍA

PRESENTADA POR:

Br. Abel Alfonso Ángeles Cumpa

Br. Jeanpierre Francisco Tesén Villanueva

LAMBAYEQUE, PERÚ

2019

Infectividad y efectividad de rizobios en
***Lablab purpureus* (L.) Sweet “Frijol chileno”**

TESIS

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN
BIOLOGÍA MICROBIOLOGÍA - PARASITOLOGÍA

APROBADA POR:

Dr. Eduardo Tejada Sánchez

PRESIDENTE

Msc. Consuelo Rojas Idrogo

SECRETARIO

Dra. Gianina Llontop Barandiarán

VOCAL

Dra. Carmen Carreño Farfán

PATROCINADORA

LAMBAYEQUE, PERÚ

2019

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.	Problema	2
1.2.	Hipotesis	2
1.3.	Objetivo general.....	2
1.4.	Objetivos específicos	2
II.	ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN	3
III.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	7
3.1.	Materiales	7
3.1.1.	Material biológico	7
3.1.2.	Población y muestra.....	7
3.2.	Métodos	7
3.2.1.	Variables	7
3.2.2.	Tipo de estudio y diseño de contrastación de hipótesis	7
3.2.3.	Primera fase: aislamiento, autenticación e identificación de rizobios.....	8
3.2.4.	Comparación de la infectividad y efectividad de los rizobios en <i>Lablab purpureus</i> (L.) Sweet	16
3.2.5.	Análisis estadístico de los datos	17
IV.	RESULTADOS	18
4.1.	Rizobios formadores de nódulos seleccionados e identificados en las bacterias simbióticas aisladas de raíces de chileno	18
4.2.	Efectividad e infectividad de cuatro cultivos de rizobios en <i>Lablab purpureus</i> (L.) Sweet	26
V.	DISCUSIÓN.....	44
VI.	CONCLUSIONES	47
VII.	RECOMENDACIONES.....	48
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
IX.	ANEXOS.....	51

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Frecuencia de rizobios productores de acidez según el tiempo de crecimiento y características de las colonias en agar extracto de levadura manitol.....	21
Tabla 2.	Frecuencia de rizobios productores de alcalinidad según el tiempo de crecimiento y características de las colonias en agar extracto de levadura manitol.....	22
Tabla 3.	Rizobios formadores de nódulos en raíces de <i>Lablab purpureus</i> (L.) Sweet.	24
Tabla 4.	Características fenotípicas diferenciales de <i>Rhizobium</i> spp.	25
Tabla 5.	Índices de efectividad de rizobios en la altura de <i>Lablab purpureus</i> (L.) Sweet, 10 días después de la inoculación, 2018	27
Tabla 6.	Prueba de comparaciones múltiples de Tukey de las alturas de plantas de <i>Lablab purpureus</i> (L.) Sweet inoculadas con <i>Rhizobium</i> spp.	28
Tabla 7.	Índices de efectividad de rizobios en la altura de <i>Lablab purpureus</i> (L.) Sweet, 20 días después de la inoculación, 2018	29
Tabla 8.	Índices de efectividad de rizobios en la altura de <i>Lablab purpureus</i> (L.) Sweet, 30 días después de la inoculación, 2018	30
Tabla 9.	Índices de efectividad de rizobios en la altura de <i>Lablab purpureus</i> (L.) Sweet, 40 días después de la inoculación, 2018	31
Tabla 10.	Índices de efectividad de rizobios en la altura de <i>Lablab purpureus</i> (L.) Sweet, 50 días después de la inoculación, 2018	33
Tabla 11.	Índices de efectividad de rizobios en la altura de <i>Lablab purpureus</i> (L.) Sweet, 60 días después de la inoculación, 2018	34
Tabla 12.	Índices de efectividad de rizobios en la biomasa área de <i>Lablab purpureus</i> (L.) Sweet, 60 días después de la inoculación	35
Tabla 13.	Número promedio de nódulos radiculares por planta de <i>Lablab purpureus</i> (L.) Sweet inoculada con rizobios	40
Tabla 14.	Índices de efectividad de <i>Rhizobium</i> spp. en la altura y biomasa y número de nódulos radiculares de <i>Lablab purpureus</i> (L.) Sweet	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Imagen digital de la ubicación geográfica de la Ciudad de Eten, provincia de Chiclayo, región Lambayeque (https://www.google.com.pe/maps/@-6.9072491,-79.8642009,16z) 9
Figura 2.	Raíces de <i>Lablab purpureus</i> (L.) Sweet con nódulos radiculares. 9
Figura 3.	Nódulos radiculares de <i>Lablab purpureus</i> (L.) Sweet..... 11
Figura 4.	Nódulos esterilizados depositados en bolsas de polietileno..... 11
Figura 5.	Adición del reactivo de Benedict en el agar levadura lactosa cultivado con rizobios..... 13
Figura 6.	Semillas de <i>Lablab purpureus</i> (L.) Sweet, sobre papel de filtro en placa de Petri. 13
Figura 7.	Semillas de <i>Lablab purpureus</i> (L.) Sweet germinadas. 15
Figura 8.	Plantas de <i>Lablab purpureus</i> (L.) Sweet en condiciones de invernadero. 15
Figura 9.	Colonias de bacterias simbióticas productoras de acidez. 19
Figura 10.	Colonias de bacterias simbióticas productoras de alcalinidad... 19
Figura 11.	Persistencia del color verde azulado del reactivo de Benedict en colonias de rizobios..... 20
Figura 12.	Viraje al color amarillo del reactivo de Benedict en colonias de <i>Agrobacterium</i> spp. 20
Figura 13.	Nódulos en raíces de <i>Lablab purpureus</i> (L.) Sweet inoculadas con rizobios..... 23
Figura 14.	Plantas de <i>Lablab purpureus</i> (L.) Sweet 10 días después de la inoculación de rizobios en comparación con el testigo. 27

Figura 15.	Plantas de <i>Lablab purpureus</i> (L.) Sweet 20 días después de la inoculación de rizobios en comparación con el testigo.	29
Figura 16.	Plantas de <i>Lablab purpureus</i> (L.) Sweet 30 días después de la inoculación de rizobios en comparación con el testigo.	30
Figura 17.	Plantas de <i>Lablab purpureus</i> (L.) Sweet 40 días después de la inoculación de rizobios en comparación con el testigo.	31
Figura 18.	Plantas de <i>Lablab purpureus</i> (L.) Sweet 50 días después de la inoculación de rizobios en comparación con el testigo.	33
Figura 19.	Plantas de <i>Lablab purpureus</i> (L.) Sweet 60 días después de la inoculación de rizobios en comparación con el testigo.	34
Figura 20.	Nódulos en raíces de <i>Lablab purpureus</i> (L.) Sweet, 60 días después de la inoculación de <i>Rhizobium</i> sp. 5.	36
Figura 21.	Nódulos en raíces de <i>Lablab purpureus</i> (L.) Sweet, 60 días después de la inoculación de <i>Rhizobium</i> sp. 9.	37
Figura 22.	Nódulos en raíces de <i>Lablab purpureus</i> (L.) Sweet, 60 días después de la inoculación de <i>Rhizobium</i> sp. 7.	38
Figura 23.	Nódulos en raíces de <i>Lablab purpureus</i> (L.) Sweet, 60 días después de la inoculación de <i>Rhizobium</i> sp. 8.	39
Figura 24.	Nódulos radiculares pequeños, medianos y grandes formados por rizobios en <i>Lablab purpureus</i> (L.) Sweet.	40
Figura 25.	Coloración característica de la parte interior de los nódulos formados por rizobios.....	41
Figura 26.	Nódulos en raíces de <i>Lablab purpureus</i> (L.) Sweet inoculadas con <i>Rhizobium</i> sp. 3 en comparación con el testigo.	41
Figura 27.	Nódulos en raíces de <i>Lablab purpureus</i> (L.) Sweet inoculadas con <i>Rhizobium</i> sp. 5 en comparación con el testigo.	42

RESUMEN

La presente investigación se realizó con el objetivo de determinar la infectividad y efectividad de rizobios en *Lablab purpureus* (L.) Sweet frijol chileno. En las raíces de chileno se colectaron nódulos, se esterilizaron superficialmente, se trituraron y las bacterias simbióticas se aislaron en agar extracto de levadura manitol, diferenciándose las colonias bacterianas productoras de acidez y alcalinidad. La presencia de *Agrobacterium* spp. se descartó con la prueba de cetolactasa en agar levadura lactosa y la adición del reactivo de Benedict después de 96 horas de cultivo. Los rizobios se autenticaron como formadores de nódulos en chileno y los cuatro cultivos con el mayor número de nódulos se seleccionaron para determinar la infectividad y efectividad durante 60 días. En las raíces de chileno se obtuvieron 50 cultivos de bacterias simbióticas, entre los que el 82% se autenticó como rizobios formadores de nódulos radiculares. Los cuatro cultivos de *Rhizobium* spp. seleccionados demostraron infectividad al formar 8 a 28 nódulos radiculares por planta y efectividad al incrementar 2,80 a 47,29% la altura y 14,68 a 33,06% la biomasa de las plantas de chileno. Se demostró la infectividad y efectividad de los rizobios en plantas de chileno.

Palabras clave: Rizobios, nódulos radiculares, chileno.

ABSTRACT

The present investigation was carried out with the objective of determining the infectivity and effectiveness of rhizobia in *Lablab purpureus* (L.) Sweet Chilean beans. In the Chilean roots, nodules were collected, superficially sterilized, crushed and the symbiotic bacteria were isolated on yeast mannitol extract agar, differentiating bacterial colonies producing acidity and alkalinity. The presence of *Agrobacterium* spp. was discarded with the cetolactase test in yeast lactose agar and the addition of Benedict's reagent after 96 hours of culture. The rhizobia were authenticated as nodule formers in Chile and the four cultures with the highest number of nodules were selected to determine infectivity and effectiveness for 60 days. In the Chilean roots, 50 cultures of symbiotic bacteria were obtained, among which 82% were authenticated as rhizobia-forming root nodules. The four cultures of *Rhizobium* spp. selected showed infectivity to form 8 to 28 root nodes per plant and effectiveness to increase height 2.80 to 47.29% and 14.68 to 33.06% biomass of Chilean plants. The infectivity and effectiveness of the rhizobia in Chilean plants was demonstrated.

Key words: Rhizobia, root nodules, Chilean.

I. INTRODUCCIÓN

El nitrógeno es el constituyente esencial de las moléculas fundamentales en todos los seres vivos y es el macronutriente más limitante en el crecimiento de las plantas, porque en el suelo, el 98% está en forma orgánica no disponible para la nutrición vegetal y solo 1–3% es mineralizado en 1 año por los procesos de amonificación y nitrificación (Frioni, 2011). Para satisfacer los requerimientos de nitrógeno, se aplican fertilizantes químicos nitrogenados (Menezes, 2009); sin embargo, solo el 50% de éstos es asimilado (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, SAGARPA, 2010). El resto es inmovilizado temporalmente por los microorganismos, se volatiliza como amoníaco o como óxidos nítrico y nitroso durante la desnitrificación, así como también se lixivia en forma de nitratos o aniones que se escurren porque no son retenidos por el suelo (Pedraza et al., 2010).

El nitrógeno molecular (N_2) es la única reserva accesible en la biósfera. El 78% de la atmósfera está constituida por N_2 y teóricamente la reducción del N_2 a nitrato es favorable, pero no ocurre fácilmente, porque el triple enlace entre los dos átomos de nitrógeno es estable y romperlo requiere mucha energía, como la proveniente de la radiación ultravioleta y combustible fósiles (Baca, Soto y Pardo, 2000). En este contexto, el nitrógeno atmosférico puede ser incorporado al ecosistema a través de la fijación biológica nitrógeno o reducción a iones amonio, que son utilizados por los seres vivos para la síntesis de compuestos nitrogenados (Frioni, 2011).

Las bacterias fijadoras de nitrógeno o diazotróficas pueden ser de vida libre, asociativa y simbiótica. Las simbióticas como los rizobios fijan el nitrógeno en el interior de nódulos, principalmente en las fabáceas, identificándose los géneros *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* y *Allorhizobium* (Garrido, 2007). Los rizobios pueden proporcionar el nitrógeno requerido por los cultivos agrícolas como *Lablab purpureus* (L.) Sweet “chileno o zarandaja”; sin embargo, la población de estas bacterias ha disminuido drásticamente por los fertilizantes y pesticidas aplicados continuamente, requiriéndose ser aisladas y caracterizados, con la

perspectiva de obtener inoculantes que puedan ser reintroducidos en los campos agrícolas. En la presente investigación se aislaron e identificaron rizobios para luego seleccionar aquellos con mayor potencial, con los que posteriormente se obtendrá un inoculante comercial, propio de la región Lambayeque.

1.1. Problema

¿Cuáles son la infectividad y efectividad de rizobios en *Lablab purpureus* (L.) Sweet “Frijol chileno”?

1.2. Hipótesis

Los rizobios presentan infectividad y más de 30% de efectividad en *Lablab purpureus* (L.) Sweet.

1.3. Objetivo general

Determinar la infectividad y efectividad de rizobios en *Lablab purpureus* (L.) Sweet.

1.4. Objetivos específicos

- 1.4.1.** Seleccionar e identificar los rizobios formadores de nódulos entre las bacterias simbióticas aisladas de raíces de frijol chileno.
- 1.4.2.** Comparar la infectividad y efectividad de cuatro cultivos de rizobios en frijol chileno.

II. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN

El aislamiento y caracterización de rizobios se ha realizado en las fabáceas *Clitoria ternatea*, *Leucaena leucocephala*, *Centrosema pubescens*, *Macroptilium atropurpureum*, *Sesbania rostrata*, *Canavalia ensiformis* y *Crotalaria juncea* (López, González y Ramírez, 2000), *Phaseolus vulgaris* (Carranza, 2004), *Centrosema pubescens Benth*, *Neonotonia wightii* Lackey, *Pueraria phoseloides (Roxls)*, *Beneth* y *Macroptilium atropurpureum* (Sosa, Elías, García y Sarmiento, 2004), *Stylosanthes guianensis*, *Centrosema molle* (Pérez, Gómez, Nápoles y Morales, 2008) *Teramnus volubilis* (Pérez, Grisales y Fuentes, 2011), *Gliricidia sepium* (Hernández, Cubillos y Milian, 2012), *Vigna unguiculata* (Mendoza y Bonilla, 2014).

En *Phaseolus vulgaris* “frijol común”, se colectaron nódulos junto a fragmentos de raíces de 0,5 cm, se esterilizaron y el contenido se sembró en agar levadura-manitol con azul de bromotimol, aislando colonias bacterianas de crecimiento rápido, amarillas, constituidas por bacilos Gram negativos, productores de acidez. Con estas bacterias se obtuvo una suspensión, que fue diluida hasta 10^{-6} y fue inoculada en plantas de frijol de 7 días. El 23% presentó nodulación con al menos una dilución, identificándose *Rhizobium leguminosarum biovar phaseolus*, sugiriéndose investigar su potencial como fijadoras de nitrógeno en las distintas variedades comerciales de frijol (Carranza, 2004).

En las fabáceas rastreras forrajeras *C. pubescens*, *C. ternatea*, *N. wightii*, *P. phoseloides* y *M. atropurpureum* se realizó la caracterización fenotípica parcial de rizobios noduladores, para seleccionar cepas y producir inoculantes. Las bacterias se aislaron en agar levadura-manitol con rojo congo, obteniéndose 50 colonias circulares, translúcidas y gomosas. Las características culturales, tasa de crecimiento y producción de acidez o alcalinidad identificaron *Rhizobium* (43%), *Bradyrhizobium* (11%), *Mesorhizobium* (2%) y en el 4% no se confirmó algún género, requiriéndose de estudios complementarios para su identificación (Sosa et al., 2004).

En *C. ensiformis*, *S. guianensis*, *C. molle*, *P. phaseoloides* y *M. atropurpureum*, las bacterias se aislaron en agar levadura manitol, LMA, a 28 °C, durante 10 días, seleccionándose dos grupos de colonias que no absorbieron el rojo congo. En el primer grupo, de crecimiento rápido, con colonias grandes de 2-5 mm grandes y mucosas, blancas, translúcidas o semitranslúcidas y con excreción de ácidos, se identificó *Rhizobium* y *Sinorhizobium*. El segundo grupo, de crecimiento lento con colonias pequeñas de 1mm circulares, secas, cremosas y excretoras de bases, se identificó como *Bradyrhizobium* spp. Todas las bacterias formaron nódulos en *Macroptilium atropurpureum* y en la fabácea de origen en cada caso, por lo que se les consideró promisorias para la inoculación en fabáceas forrajeras (Pérez et al., 2008).

En *P. vulgaris*, se colectaron nódulos de plantaciones en floración, se esterilizaron superficialmente y las bacterias se aislaron en agar levadura manitol, LMA. Todos los rizobios nodularon *Phaseolus vulgaris* y las secuencias del gen nod C demostraron pertenencia a la biodiversidad de phaseoli, con los mismos alelos de este gen que las cepas de *Rhizobium etli* y *R. leguminosarum*. La efectividad simbiótica osciló entre 10 a 40% y el porcentaje de nitrógeno derivado de la fijación fue de 13–73%. En el proceso de selección en microcosmos, dos de las cinco cepas incrementaron el desarrollo con 22% más de biomasa y 19% en rendimiento de grano, considerándose con potencial como bioinoculantes para el cultivo de habichuela (Reyes, Ramírez y Lozano, 2010).

En la fabácea *Teramnus volubilis*, los nódulos radiculares se caracterizaron y las bacterias se aislaron en agar levadura manitol. Los nódulos presentaron forma redondeada, coloración externa café claro-oscuro y coloración interna rojo, verde oscuro y blanco. El número de nódulos fue 3-37 por raíz; el diámetro 0,76-1,16 mm y la densidad poblacional 15×10^8 UFC mL⁻¹. Se obtuvieron 28 aislados, de los que 50% presentaron características del género *Rhizobium*. El Análisis de Correspondencias Múltiples clasificó cinco grupos de morfotipos según la morfología, tamaño y color de las colonias. El análisis de *Cluster Alomerativo*, con una confiabilidad de 88% mostró cuatro grupos con base al contenido de fósforo, capacidad de intercambio

catiónico y número de nódulos. Se demostró alta variabilidad de bacterias del género *Rhizobium*, asociadas a raíces de *Teramnus volubilis* (Pérez et al., 2011).

En las fabáceas forrajeras *L. leucocephala* y *G. sepium* se aislaron bacterias simbióticas de nódulos, con porcentajes de recuperación de 94 y 86%, respectivamente. Con base a las pruebas de identificación fisiológica en LMA + azul de bromotimol, LMA + Rojo Congo, agar peptona glucosa + púrpura de bromocresol, prueba de cetolactasa en agar levadura lactosa y crecimiento en agar XLD y Hektoen, se identificaron 22 cepas de *Rhizobium*. Todas las cepas crecieron a pH 9,0 y 10,0; así como también a 30 y 37 °C. La tolerancia a 1 y 2% de NaCl fue un criterio adicional que permitió diferenciar *Rhizobium* de *Bradyrhizobium*, considerándose la necesidad de determinar el efecto como promotores del crecimiento de estas bacterias en invernadero y campo (Hernández et al., 2012).

En raíces de *P. vulgaris* se colectaron nódulos viables, se desinfectaron y el contenido se sembró en agar manitol extracto de levadura-rojo congo. Se obtuvieron diez cultivos puros de rizobios, con colonias de 1–7 mm de diámetro, viscosas, blanquecino-rosadas. Con base a la ausencia de crecimiento en agar Luria Bertoni y crecimiento con agar peptona glucosa, PGA y agar manitol, LMA, se determinó predominancia de rizobios de crecimiento rápido del género *Rhizobium* (60%), en comparación con los de crecimiento lento *Bradyrhizobium* (40%). Estas bacterias se conservaron en agar manitol, para su posterior caracterización genética y filogenética (Villanueva y Quintana, 2012).

La adaptación de las fabáceas en suelos afectados por la salinidad puede ser incrementada por rizobios tolerantes a estas condiciones desfavorables. Con el objetivo de aislarlos y caracterizarlos realizaron prospecciones de nódulos en fabáceas nativas, naturalizadas y comerciales. Se extrajo suelo a una profundidad de 0–0,30 cm y en macetas se sembraron *Clitoria ternatea*, *Leucaena leucocephala*, *Centrosema pubescens*, *Macroptilium atropurpureum*, *Sesbania rostrata*, *Canavalia ensiformis* y *Crotalaria juncea*. Se encontró nodulación en todas las fabáceas, a excepción de *C. pubescens*. En agar levadura manitol se obtuvieron 18 cultivos bacterianos de crecimiento rápido, con colonias de apariencia gelatinosa o

acuosa, textura cremosa o elástica y forma redondeada o plana. Se concluyó que las especies de *Rhizobium* spp. presentes en las fabáceas de suelos salinos son potenciales como inoculantes fijadores de nitrógeno (López et al, 2000).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales

3.1.1. Material biológico

Nódulos radiculares de plantas de chileno, cultivos puros de rizobios y semillas de chileno.

3.1.2. Población y muestra

En la investigación descriptiva, la población estuvo constituida por los nódulos radiculares de plantas de chileno en los campos agrícolas de la región Lambayeque y se investigaron 54 muestras probabilísticas de nódulos radiculares colectados durante agosto-diciembre de 2017. El número de muestras fue calculado (Alvitres, 2000), con una prevalencia de 90%, determinada en un estudio piloto por los investigadores (Anexo 1). En la investigación explicativa la población fueron los rizobios aislados de chileno durante agosto-diciembre de 2017 y la muestra no probabilística por conveniencia estuvo constituida por cuatro cultivos de rizobios.

3.2. Métodos

3.2.1. Variables

Variable independiente: Cultivos (4) de rizobios.

Variables dependientes:

Número de nódulos radiculares (Infectividad)

Desarrollo vegetativo de chileno (Efectividad)

3.2.2. Tipo de estudio y diseño de contrastación de hipótesis

La investigación se realizó en dos fases. La primera fase descriptiva correspondió al aislamiento, autenticación e identificación de los rizobios aislados de nódulos radiculares. En la segunda fase explicativa se determinó la infectividad y efectividad de cuatro cultivos de rizobios en plantas de chileno. La hipótesis en la primera fase se contrastó con el diseño de una sola casilla de Goode y Hatt (1986) y en la segunda fase con el diseño completamente aleatorio, DCA (Hernández, Fernández y Baptista, 2014).

3.2.3. Primera fase: aislamiento, autenticación e identificación de rizobios

En la primera fase de la investigación se aislaron bacterias simbióticas de nódulos radiculares de chileno, se determinó la pureza de los rizobios, se autenticaron y se identificaron.

a. Lugar de muestreo y obtención de muestras

Las muestras de nódulos radiculares fueron colectadas en nueve campos comerciales de chileno en estado de floración en la Ciudad de Eten, provincia de Chiclayo, región Lambayeque (Figura 1). Eten está ubicado entre los paralelos 6°54'5346" latitud sur y 79°51'58, 0536" longitud oeste. La ciudad tiene una superficie total de 84,78 km² y limita por el norte con Monsefú, por el sur con Puerto Eten, por el este con Reque y por el oeste con el Océano Pacífico (Municipalidad Distrital De Eten).

En los campos de cultivo de chileno, se seleccionaron las plantas más vigorosas en floración (seis plantas por campo), con ayuda de una palana se retiró el suelo radicular y cuidadosamente se extrajeron las raíces con los nódulos radiculares y el suelo adherido (Figura 2), se depositaron en bolsas de polietileno y se transportaron en una caja térmica ($10 \pm 1^{\circ}\text{C}$) hacia el laboratorio de Microbiología y Parasitología, sección Biotecnología Microbiana de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo en Lambayeque.

b. Aislamiento de las bacterias simbióticas

Las raíces se sacudieron suavemente para eliminar el suelo rizosférico y con una tijera se separaron ocho a diez nódulos con más de 3 mm de diámetro, incluyendo un fragmento de raíz de 1 cm a cada lado. Los nódulos se depositaron en un tamiz de 125 mallas por pulgada y se lavaron bajo el chorro de agua potable hasta eliminar el suelo remanente (Zúñiga, 2008).

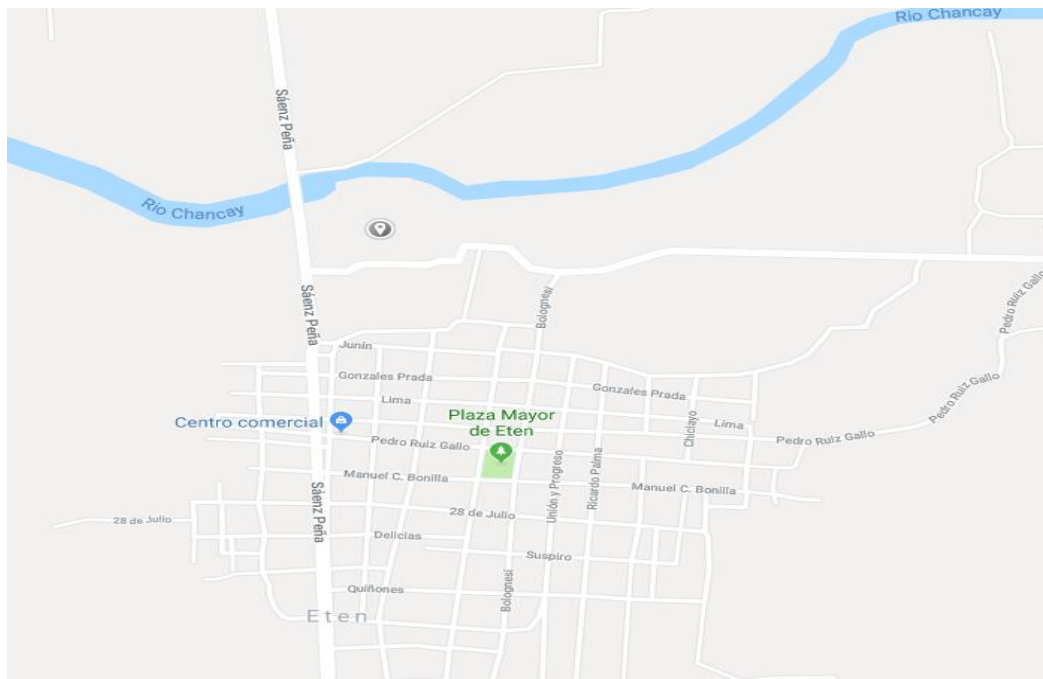


Figura 1. Imagen digital de la ubicación geográfica de la Ciudad de Eten, provincia de Chiclayo, región Lambayeque (<https://www.google.com.pe/maps/@-6.9072491,-79.8642009,16z>)



Figura 2. Raíces de *Lablab purpureus* (L.) Sweet con nódulos radiculares.

Autoría propia

Los nódulos (Figura 3) se depositaron en frasco de vidrio de 200 mL de capacidad previamente esterilizados (horno 180°C por 2 horas) y se esterilizaron superficialmente mediante el método de Vincent (1970), descrito por Zúñiga (2008). Se lavaron con 80 mL de alcohol 70%, durante 1 minuto, 80 mL de una solución 3% de hipoclorito de sodio (lejía comercial 5%) por 3 minutos y se enjuagaron por seis veces consecutivas con agua destilada esterilizada (2 minutos por enjuague). Los nódulos esterilizados se depositaron en bolsas de polietileno de 8 cm² (Figura 4), se trituraron con ayuda de un pilón y del material obtenido se tomó una alícuota para sembrarla por agotamiento y estría en placas de Petri con agar extracto de levadura manitol (LMA) más 0,5% de azul de bromotimol (Anexo 2).

La incubación se realizó a 30°C hasta por 7 días, seleccionándose las colonias de bacterias amarillas productoras de acidez (*Rhizobium*, *Mesorhizobium*) y azules productores de alcalinidad (*Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*). Las bacterias se cultivaron en el mismo agar por agotamiento y estría las veces requeridas hasta observar crecimiento homogéneo y presencia de bacilos Gram negativos (Mendoza y Bonilla, 2004), y las colonias se caracterizaron registrando el tiempo, diámetro, textura, apariencia, color, presencia de goma y viraje del indicador (Zúñiga, 2008).

Las bacterias aisladas se cultivaron en viales con LMA, a 30°C, durante 24 a 48 horas, constituyendo los cultivos puros de bacterias simbióticas que se llevaron a refrigeración (8°C) para su mantenimiento y cada 30 días se cultivaron en medio LMA fresco para asegurar su viabilidad.



Figura 3. Nódulos radiculares de *Lablab purpureus* (L.) Sweet.

Autoría propia



Figura 4. Nódulos esterilizados depositados en bolsas de polietileno.

Autoría propia

c. Determinación de la pureza en las bacterias simbióticas

La pureza de las bacterias simbióticas (Zúñiga, 2008) se determinó para verificar la presencia de rizobios y descartar *Agrobacterium* spp. Las bacterias simbióticas se cultivaron por agotamiento y estría en agar levadura lactosa LLA y se incubaron a 30°C hasta por 96 horas. A continuación, en cada placa de Petri se vertieron 5 mL de reactivo de Benedict (Figura 5) y después de 10 minutos de reposo a temperatura ambiental (25°C) se observó el color del reactivo. La persistencia del azul, indicó la pureza de las colonias de los rizobios y el cambio al verde-amarillento evidenció la producción de α -cetolactasa, característica del género *Agrobacterium* y no de rizobios.

d. Autenticación de los rizobios

Los rizobios se autenticaron como formadores de nódulos, inoculándolos en semillas de chileno a las que previamente se les determinó el porcentaje de germinación (Silva y Zúñiga, 2018). Cinco placas de Petri se acondicionaron colocando en la base papel filtro humedecido con agua destilada esterilizada y con una pinza esterilizada se depositaron 20 semillas de chileno por placa. Las placas de Petri se cubrieron con papel aluminio y se llevaron a la estufa a 30°C, humedeciendo el papel filtro a diario hasta observar el máximo de germinación a los 7 días.

En un vaso de precipitación de 250 mL de capacidad se depositaron 200 semillas de chileno, se desinfectaron con hipoclorito de sodio 2% durante 5 minutos, se enjuagaron cinco veces consecutivas con agua destilada esterilizada (2 minutos por enjuague) y se hidrataron durante 3 horas con 400 mL de agua destilada esterilizada. Las semillas que mostraron turgencia se extrajeron con una pinza y se depositaron en placas de Petri de 10 cm de diámetro, cuya base previamente fue recubierta interiormente con papel de filtro esterilizado y humedecido con 5 mL de agua destilada esterilizada (Figura 6).



Figura 5. Adición del reactivo de Benedict en el agar levadura lactosa cultivado con rizobios.
Autoría propia



Figura 6. Semillas de *Lablab purpureus* (L.) Sweet, sobre papel de filtro en placa de Petri.
Autoría propia

Las placas de Petri se cubrieron con papel aluminio y se llevaron a la estufa a 24°C durante 72 horas, tiempo requerido para el desarrollo de las radículas. El inóculo bacteriano se obtuvo cultivando los rizobios en 10 mL de caldo extracto de levadura manitol, a 30°C durante 2 a 7 días o tiempo requerido para alcanzar la turbidez del tubo 3 del nefelómetro de MacFarland (10^8 cel mL⁻¹). Las semillas germinadas (Figura 7) que presentaron radículas de punta fina se seleccionaron para la prueba de autenticación (Zúñiga, 2008), descartándose las de punta roma. Las semillas seleccionadas se colocaron en placas de Petri previamente esterilizadas, con un bisturí y pinzas estériles se eliminó el pericarpio y sobre ellas se vertieron 10 mL del inóculo bacteriano.

Después de 0,5 horas de la inoculación de los rizobios, las semillas se sembraron en bolsas de polietileno negro (dos semillas por bolsa) conteniendo 0,5 kg de una mezcla de suelo: arena: humus (1:1:1), con tres ciclos de esterilización consecutivos: 2 horas a 120°C cada 12 horas (Mendoza y Bonilla, 2014). Las plantas se mantuvieron en el invernadero (Figura 8), realizándose los riegos correspondientes con agua previamente declorada (24 horas) según los requerimientos de las plantas. La observación de nódulos formados en las raíces de las plantas, después de 6 semanas de la inoculación autenticó a los rizobios como formadores de nódulos (Zúñiga, 2008). Los cuatro cultivos de rizobios con el mayor número de nódulos en las raíces de chileno fueron seleccionados para continuar con la investigación.

e. Identificación fenotípica del género de los rizobios

La identificación fenotípica del género de los rizobios seleccionados (Zúñiga, 2008), se realizó mediante la caracterización morfológica de las colonias de las bacterias en agar LMA, verificación de la producción de acidez o alcalinidad en agar LMA y determinación del efecto de los agentes físicos-químicos en el crecimiento.



Figura 7. Semillas de Lablab purpureus (L.) Sweet germinadas.

Autoría propia



Figura 8. Plantas de Lablab purpureus (L.) Sweet en condiciones de invernadero.

Autoría propia

El efecto de los agentes físicos–químicos en el crecimiento se realizó con las bacterias cultivadas en caldo LMA hasta alcanzar 10^6 - 10^8 cel mL⁻¹ (3-5 días), se tomaron 5 µL y se sembraron según las pruebas correspondientes. Para investigar el crecimiento a diferentes pH, se sembraron en caldo LMA a pH 4, 5, 8 y 9, durante 10 días para rizobios. Para el crecimiento a diferentes niveles de NaCl se sembraron en caldo LMA con 0,125; 0,25; 0,5 y 1 % NaCl, se incubaron y se evaluó el crecimiento cada 24 horas por 10 días. Para investigar el crecimiento a diferentes temperaturas, las bacterias se sembraron en caldo LMA y se incubaron a 28, 37 y 40 °C, registrando el crecimiento cada 24 horas hasta por 15 días para rizobios, respectivamente.

3.2.4. Comparación de la infectividad y efectividad de los rizobios en

***Lablab purpureus* (L.) Sweet**

El ensayo correspondió a un diseño completamente aleatorio (DCA), con cinco tratamientos correspondientes a: Testigo absoluto (T0) y rizobios (T1 a T4). Las semillas de chileno se hicieron germinar, se seleccionaron las que presentaron radículas de punta y fina y se inocularon con los rizobios, tal como se explicó en el ítem 3.2.3.d. Las semillas previamente inoculadas se sembraron en macetas de arcilla de 5 kg de capacidad (tres semillas por maceta), conteniendo 3 kg de una mezcla de suelo: arena: humus (1:1:1).

El análisis físico-químico del suelo se realizó en el Instituto Nacional de Innovación Agraria, Estación Experimental Vista Florida de Chiclayo. Según los resultados (Anexo 3) el suelo presentó una textura franco arenosa, pH ligeramente alcalino (7,2), baja salinidad (2,52 dSm⁻¹), niveles bajos de materia orgánica (0,47%), fósforo disponible (6,50 ppm) y potasio (274,0 ppm).

El cultivo de chileno y la inoculación de rizobios se realizó entre 10 de febrero al 24 de setiembre de 2018, registrándose las temperaturas, máxima (29°C), mínima (23°C) y media (26°C), valores obtenidos por la Estación Meteorológica de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo en el Fundo “El Ciénago” de Lambayeque (Anexo 4).

Las plantas se mantuvieron en el invernadero, realizándose los riegos correspondientes, según los requerimientos. Transcurridos 15 días después de la siembra, la plántula menos vigorosa se eliminó, quedando dos plántulas por tratamiento. A los 10, 20, 30, 40, 50 y 60 días se determinó la efectividad y a los

60 días la infectividad. La efectividad correspondió el efecto de los rizobios en la altura (10 a 60 días) y biomasa aérea (60 días) de las plantas y la infectividad al número de nódulos formados por los rizobios en las raíces (60 días). Asimismo, se calcularon los índices de efectividad (Carreño, 2009):

$$\text{EIE (\%)} = \frac{\text{Tratamiento con inoculación} - \text{Control sin inoculación}}{\text{Control sin inoculación}} \times 100$$

3.2.5. Análisis estadístico de los datos

Los valores de la altura y biomasa aérea se ordenaron en tablas y se les realizó el análisis de varianza para determinar las diferencias estadísticas entre los tratamientos y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey para establecer la significancia entre ellos (Hernández et al., 2014). Se utilizaron los programas de Microsoft Office Word, Excel versión 2010 y Minitab 15.

IV. RESULTADOS

4.1. Rizobios formadores de nódulos seleccionados e identificados en las bacterias simbióticas aisladas de raíces de chileno

El 93,3 % (28) de las muestras de nódulos radiculares resultaron positivos al aislamiento de bacterias simbióticas, obteniéndose 50 cultivos puros en agar extracto de levadura de manitol, LMA. Se observó que el 84% (42) de los cultivos bacterianos desarrollaron colonias amarillas productoras de acidez (Figura 9) y el 16% (8) colonias azules productoras de alcalinidad (Figura 10).

El 82% (41) de los cultivos de bacterias simbióticas se identificó como rizobios, verificándose la pureza al observar la persistencia del color azulado del reactivo de Benedict después de 10 minutos de contacto con las colonias bacterianas (Figura 11). A diferencia, se observó un color verde amarillento en el reactivo de Benedict en el 18% (9) de los cultivos bacterianos identificados como *Agrobacterium* spp. (Figura 12).

El 82,9% (34) de las colonias de rizobios fueron productoras de acidez, con tiempos de crecimiento de 24 a 72 horas, un diámetro de 0,5 a 4 mm, en su mayoría una textura cremosa, apariencia opaca, color beige y abundante goma (Tabla 1). El 17,1% (7) de las colonias de rizobios fueron productores de alcalinidad, con un tiempo de crecimiento de 48 horas, un diámetro 0,5 a 3,5 mm, en su mayoría con textura cremosa, apariencia translúcida y escasa a regular goma (Tabla 2).

El 73% (30) de los rizobios se autentificaron, al observar nódulos radiculares en las plantas de chileno, después de 6 semanas de su inoculación (Figura 13). El número de nódulos osciló entre 9 a 19 (Tabla 3). Los cultivos de rizobios 5, 9, 7 y 8 se seleccionaron para continuar con la investigación, debido a que alcanzaron entre 15 a 19 nódulos. Estos rizobios productores de acidez en LMA, se identificaron como *Rhizobium* spp. (Tabla 4).

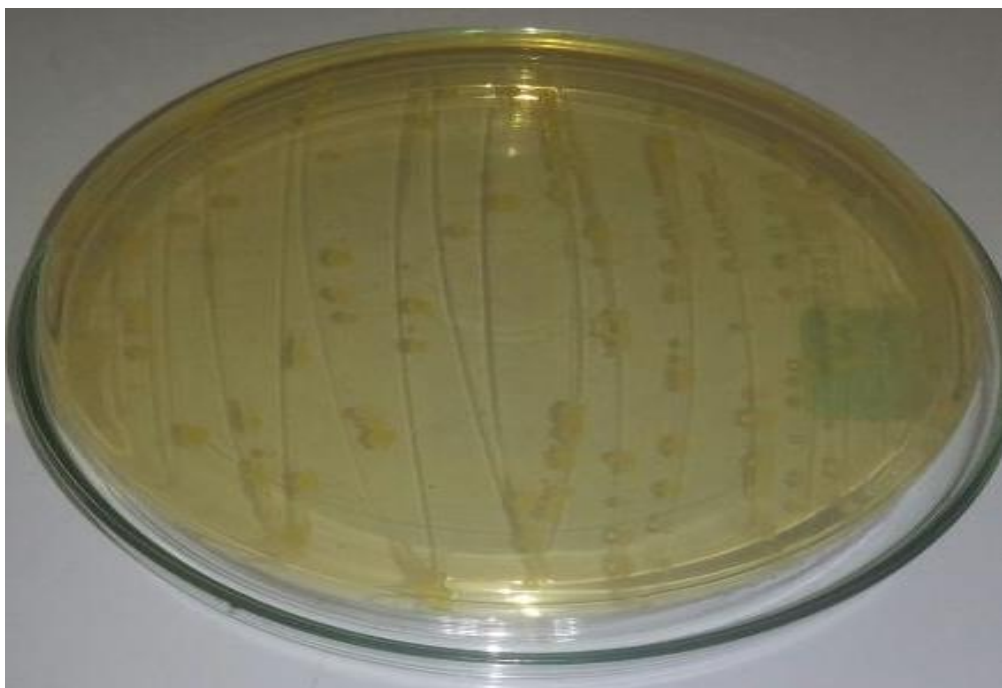


Figura 9. Colonias de bacterias simbióticas productoras de acidez.

Autoría propia

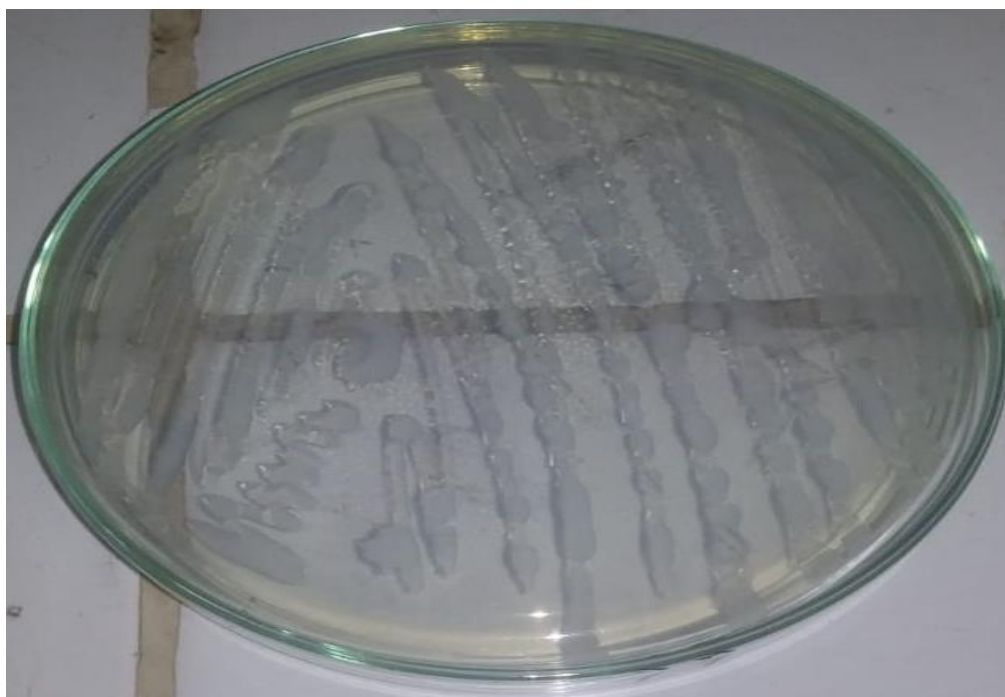


Figura 10. Colonias de bacterias simbióticas productoras de alcalinidad.

Autoría propia

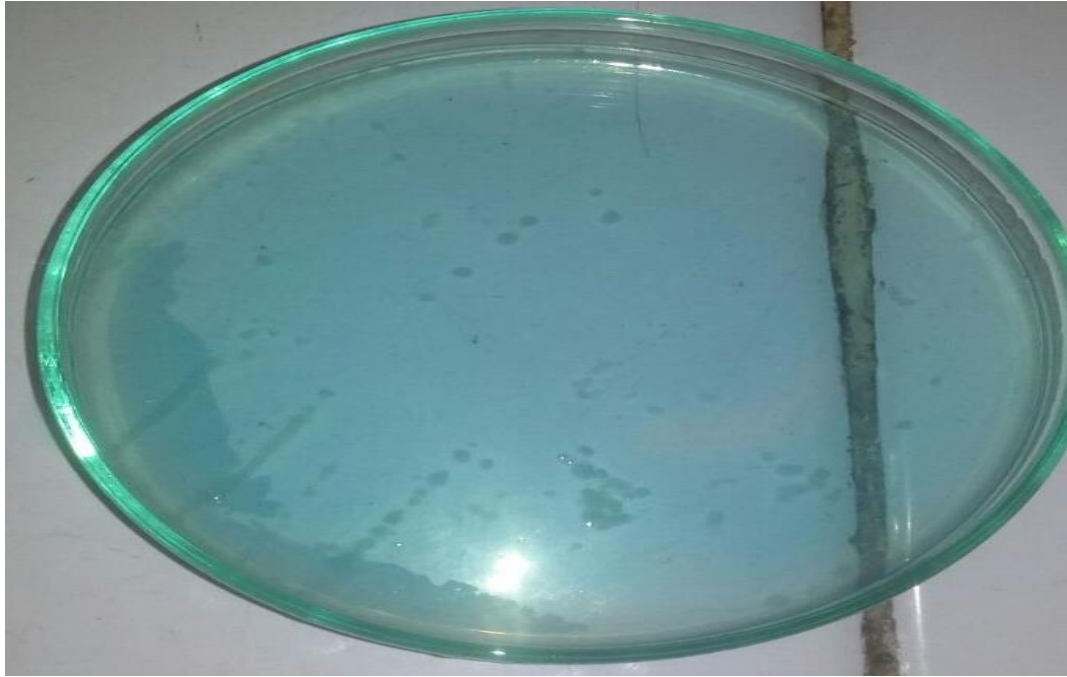


Figura 11. Persistencia del color verde azulado del reactivo de Benedict en colonias de rizobios.

Autoría propia

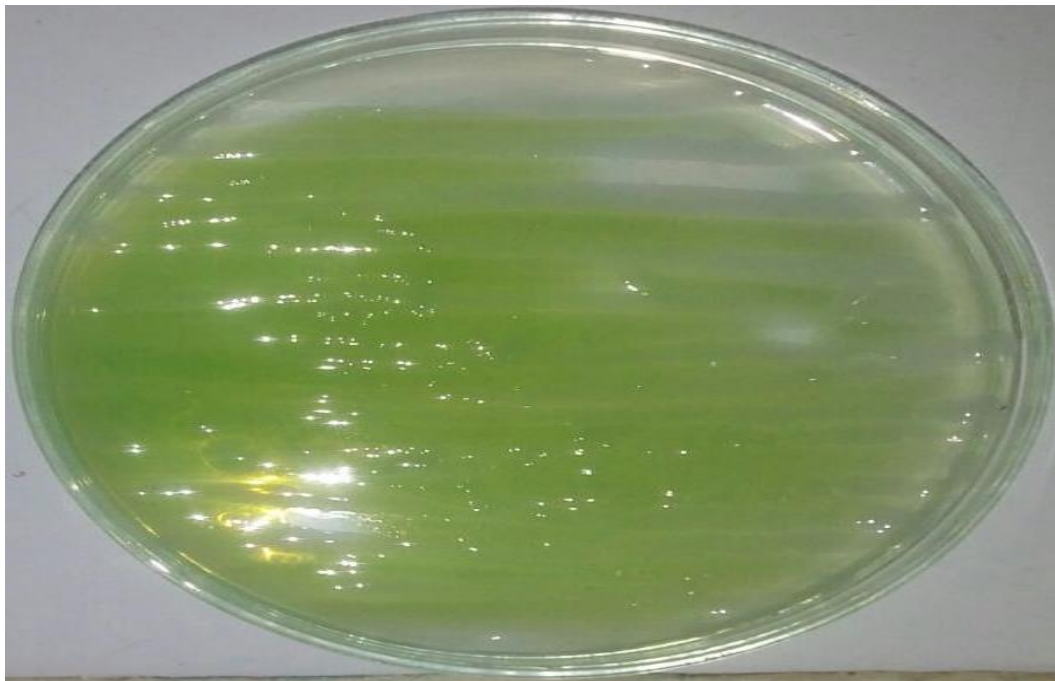


Figura 12. Viraje al color amarillo del reactivo de Benedict en colonias de *Agrobacterium* spp.

Autoría propia

Tabla 1.

Frecuencia de rizobios productores de acidez según el tiempo de crecimiento y características de las colonias en agar extracto de levadura manitol

Cultivos		Tiempo (horas)	Diámetro (mm)	Textura	Apariencia	Color	Goma
Nº	%						
1	2,4	24	1,0	Creмоса	O	Beige	Abundante
1	2,4	24	4,0	Creмоса	O	Blanco	Abundante
1	2,4	24	2,5	Ligosa	O	Blanco	Abundante
1	2,4	48	3,5	Ligosa	O	Beige	Abundante
1	2,4	72	0,5	Creмоса	O	Blanco	Regular
1	2,4	72	1,0	Creмоса	O	Blanco	Regular
2	4,7	48	0,5	Creмоса/ Ligosa	O	Blanco	Regular/ Abundante
2	4,7	72	2,0	Creмоса	O/T	Beige/ Blanco	Regular/ Abundante
3	7,1	24	3,0	Creмоса/ Ligosa	O	Beige	Abundante
5	11,9	48	1,0	Creмоса/ Ligosa	O/T	Beige/ Blanco	Regular
16	42,8	24	2,0	Creмоса	O	Beige/ Blanco	Regular/ Abundante

O = Opaca, T= Translúcida, ST= Semitranslúcida

Autoría propia

Tabla 2.

Frecuencia de rizobios productores de alcalinidad según el tiempo de crecimiento y características de las colonias en agar extracto de levadura manitol

Cultivos		Tiempo (horas)	Diámetro (mm)	Textura	Apariencia	Color	Goma
Nº	%						
1	12,5	48	3,5	Creмоса	T	Be	E
2	25,0	48	0,5	Creмоса	T	Bl	E
4	50,0	48	1,0	Creмоса/Ligosa	O/T/ST	Be/Bl	E/R

O=Opaca, T=Translúcida, ST= Semitranslúcida, Be= Beige, Bl= Blanca, E= Escasa, R= Regular

Autoría propia



Figura 13. Nódulos en raíces de *Lablab purpureus* (L.) Sweet inoculadas con rizobios.

Autoría propia

Tabla 3.
Rizobios formadores de nódulos en raíces de Lablab purpureus (L.) Sweet.

Rizobios (código)	Nódulos (N°)
5	19
9	18
7	15
8	15
28	14
18	14
15	14
27	14
35	14
17	13
19	13
34	13
2	12
26	12
30	12
37	12
10	11
11	11
29	11
36	11
40	11
41	11
6	10
14	10
20	10
21	10
31	10
38	10
39	10
12	9

Autoría propia

Tabla 4.

Características fenotípicas diferenciales de Rhizobium spp.

<i>Rhizobium spp.</i>				
	5	9	7	8
Colonias en agar LMA				
Tiempo (horas)	48	24	24	72
Diámetro (mm)	1,0	2,0	3,0	2,0
Textura	Cremosa/Ligosa	Cremosa	Cremosa/Ligosa	Cremosa
Apariencia	O/T	O	O	O/T
Color	Beige/Blanco	Beige/Blanco	Beige	Beige/Blanco
Crecimiento en caldo LMA				
pH 4	+	+	+	+
pH 5	+	+	+	+
pH 8	-	+	+	+
pH 9	-	-	-	-
NaCl 0,125%	+	-	-	+
NaCl 0,25%	+	-	-	-
NaCl 0,5	+	+	+	+
NaCl 1%	+	-	-	+
28 °C	+	+	+	+
37 °C	+	+	+	+
40 °C	+	+	+	+

O = Opaca, T= Translúcida, ST= Semitranslúcida

Autoría propia

4.2. Efectividad e infectividad de cuatro cultivos de rizobios en *Lablab purpureus* (L.) Sweet “chileno”

Los rizobios demostraron efectividad al incrementar la altura de las plantas de chileno a los 10, 20, 30, 40, 50 y 60 días, así como también la biomasa aérea a los 60 días después de la inoculación (Figuras 14 a 19).

A los 10 días la altura promedio fue de 25,5 a 29,9 cm en las plantas inoculadas con rizobios, alcanzándose niveles de efectividad de 25,61 a 47,29% (Figura 14, tabla 5). La prueba F del análisis de varianza demostró alta significancia (Anexo 5) y según la prueba de comparaciones múltiples de Tukey (Tabla 6) el mayor valor en la altura se alcanzó con *Rhizobium* sp.7, diferenciándose significativamente de los demás tratamientos.

A los 20 días la altura promedio fue de 43,8 a 48,9 cm en las plantas inoculadas con rizobios, alcanzándose niveles de efectividad de 11,45 a 24,42% (Figura 15, tabla 7). La prueba F del análisis de varianza demostró alta significancia (Anexo 5) y según la prueba de comparaciones múltiples de Tukey (Tabla 6) el mayor valor en la altura se alcanzó con *Rhizobium* sp.7, diferenciándose estadísticamente de los demás tratamientos.

A los 30 días la altura promedio fue de 82,5 a 90,1 cm en las plantas inoculadas con rizobios, alcanzándose niveles de efectividad de 4,69 a 14,34% (Figura 16, tabla 8). La prueba F del análisis de varianza demostró alta significancia (Anexo 5) y según la prueba de comparaciones múltiples de Tukey (Tabla 6) el mayor valor en la altura se alcanzó con *Rhizobium* sp.7, diferenciándose significativamente de los demás tratamientos.

A los 40 días la altura promedio fue de 132,1 a 138,4 cm en las plantas inoculadas con rizobios, alcanzándose niveles de efectividad de 2,80 a 7,70% (Figura 17, tabla 9). La prueba F del análisis de varianza demostró alta significancia (Anexo 5) y según la prueba de comparaciones múltiples de Tukey (Tabla 6) el mayor valor en la altura se alcanzó con *Rhizobium* sp.7, diferenciándose estadísticamente de los demás tratamientos.



Figura 14. Plantas de *Lablab purpureus* (L.) Sweet 10 días después de la inoculación de rizobios en comparación con el testigo.

Autoría propia

Tabla 5.

Índices de efectividad de rizobios en la altura de *Lablab purpureus* (L.) Sweet, 10 días después de la inoculación, 2018

Tratamientos	Altura	
	cm*	IE (%)*
Testigo	20,3	----
<i>Rhizobium</i> sp.7	29.9	47,29
<i>Rhizobium</i> sp.8	28,6	40,88
<i>Rhizobium</i> sp.9	27,6	35,96
<i>Rhizobium</i> sp.5	25,5	25,61

*Promedio de cuatro repeticiones

Autoría propia

Tabla 6.

Prueba de comparaciones múltiples de Tukey de la altura de plantas de Lablab purpureus (L.) Sweet inoculadas con Rhizobium spp.

Tratamientos	Altura (cm)/días											
	10	Sign.	20	Sign.	30	Sign.	40	Sign.	50	Sign.	60	Sign.
Testigo	20,32	e	39,32	d	78,81	e	128,50	e	174,37	e	184,67	e
<i>Rhizobium</i> sp.5	25,52	d	43,80	c	82,51	d	132,08	d	180,21	d	192,77	d
<i>Rhizobium</i> sp.9	27,55	c	45,45	b	85,13	c	133,27	c	181,31	c	195,06	c
<i>Rhizobium</i> sp.7	29,87	a	48,85	a	90,12	a	138,37	a	188,30	a	207,53	a
<i>Rhizobium</i> sp.8	28,62	b	48,51	a	87,35	b	135,78	b	185,47	b	205,58	b

Autoría propia



Figura 15. Plantas de *Lablab purpureus* (L.) Sweet 20 días después de la inoculación de rizobios en comparación con el testigo.

Autoría propia

Tabla 7.

Índices de efectividad de rizobios en la altura de *Lablab purpureus* (L.) Sweet, 20 días después de la inoculación, 2018

Tratamientos	Altura	
	cm*	IE (%)
Testigo	39,3	----
<i>Rhizobium</i> sp.7	48,9	24,42
<i>Rhizobium</i> sp.8	48,5	23,40
<i>Rhizobium</i> sp.9	45,5	15,77
<i>Rhizobium</i> sp.5	43,8	11,45

*Promedio de cuatro repeticiones

Autoría propia



Figura 16. Plantas de *Lablab purpureus* (L.) Sweet 30 días después de la inoculación de rizobios en comparación con el testigo.

Autoría propia

Tabla 8.

Índices de efectividad de rizobios en la altura de *Lablab purpureus* (L.) Sweet, 30 días después de la inoculación, 2018

Tratamientos	Altura	
	cm*	IE (%)
Testigo	78,8	----
<i>Rhizobium</i> sp.7	90,1	14,34
<i>Rhizobium</i> sp.8	87,4	10,91
<i>Rhizobium</i> sp.9	85,1	7,99
<i>Rhizobium</i> sp.5	82,5	4,69

*Promedio de cuatro repeticiones

Autoría propia



Figura 17. Plantas de *Lablab purpureus* (L.) Sweet 40 días después de la inoculación de rizobios en comparación con el testigo.

Autoría propia

Tabla 9.

Índices de efectividad de rizobios en la altura de *Lablab purpureus* (L.) Sweet, 40 días después de la inoculación, 2018

Tratamientos	Altura	
	cm*	IE (%)
Testigo	128,5	----
<i>Rhizobium</i> sp.7	138,4	7,70
<i>Rhizobium</i> sp.8	135,8	5,68
<i>Rhizobium</i> sp.9	133,3	3,73
<i>Rhizobium</i> sp.5	132,1	2,80

*Promedio de cuatro repeticiones

Autoría propia

A los 50 días la altura promedio fue de 180,2 a 188,3 cm en las plantas inoculadas con rizobios, alcanzándose niveles de efectividad de 3,32 a 7,97% (Figura 18, tabla 10). La prueba F del análisis de varianza demostró alta significancia (Anexo 5) y según la prueba de comparaciones múltiples de Tukey (Tabla 6) el mayor valor en la altura se alcanzó con *Rhizobium* sp.7, diferenciándose significativamente de los demás tratamientos.

A los 60 días la altura promedio fue de 192,8 a 207,5 cm en las plantas inoculadas con rizobios, alcanzándose niveles de efectividad de 4,38 a 12,34% (Figura 19, tabla 11). La prueba F del análisis de varianza demostró alta significancia (Anexo 5) y según la prueba de comparaciones múltiples de Tukey (Tabla 6) el mayor valor en la altura se alcanzó con *Rhizobium* sp.7, diferenciándose estadísticamente de los demás tratamientos.

A los 60 días el peso de la biomasa aérea promedio fue de 26,95 a 31,27g en las plantas inoculadas con rizobios, alcanzándose índices de efectividad de 14,68 a 33,06 %. La prueba F del análisis de varianza demostró alta significancia (Anexo 5) y según la prueba de comparaciones múltiples de Tukey el mayor valor en la biomasa aérea se alcanzó con *Rhizobium* sp.7, diferenciándose significativamente de los demás tratamientos (Tabla 12).

La infectividad de todos los rizobios se demostró con los nódulos formados y observados en las raíces de las plantas a los 60 días después de la inoculación (Figuras 20 a 23). Los nódulos fueron pequeños, medianos y grandes (Figura 24), predominando los medianos. En todos los nódulos se observó el color rojo característico (Figura 25). El mayor número promedio de nódulos por planta correspondió a *Rhizobium* sp. 7 con 27,86 y el menor número a *Rhizobium* sp. 5 con 8,25 (Tabla 13, figuras 26,27). De igual manera, los mayores valores en la efectividad en la altura y biomasa correspondieron a *Rhizobium* sp. 7 y los menores valores a *Rhizobium* sp. 5 (Tabla 14).



Figura 18. Plantas de *Lablab purpureus* (L.) Sweet 50 días después de la inoculación de rizobios en comparación con el testigo.

Autoría propia

Tabla 10.

Índices de efectividad de rizobios en la altura de *Lablab purpureus* (L.) Sweet, 50 días después de la inoculación, 2018

Tratamientos	Altura	
	cm*	IE (%)
Testigo	174,4	----
<i>Rhizobium</i> sp.7	188,3	7,97
<i>Rhizobium</i> sp.8	185,5	6,36
<i>Rhizobium</i> sp.9	181,3	3,95
<i>Rhizobium</i> sp.5	180,2	3,32

*Promedio de cuatro repeticiones

Autoría propia



Figura 19. Plantas de *Lablab purpureus* (L.) Sweet 60 días después de la inoculación de rizobios en comparación con el testigo.

Autoría propia

Tabla 11.

Índices de efectividad de rizobios en la altura de *Lablab purpureus* (L.) Sweet, 60 días después de la inoculación, 2018

Tratamientos	Altura	
	cm*	IE (%)
Testigo	184,7	----
<i>Rhizobium</i> sp.7	207,5	12,34
<i>Rhizobium</i> sp.8	205,6	11.31
<i>Rhizobium</i> sp.9	195,1	5,63
<i>Rhizobium</i> sp.5	192,8	4,38

*Promedio de cuatro repeticiones

Autoría propia

Tabla 12.

Índices de efectividad de rizobios en la biomasa área de Lablab purpureus (L.) Sweet, 60 días después de la inoculación

Tratamientos	Biomasa		Significancia
	g*	IE (%)	
Testigo	23,50	----	e
<i>Rhizobium</i> sp.7	31,27	33,06	a
<i>Rhizobium</i> sp.8	30,35	29,14	b
<i>Rhizobium</i> sp.9	28,85	22,76	c
<i>Rhizobium</i> sp.5	26,95	14,68	d

*Promedio de cuatro repeticiones

Autoría propia



Figura 20. Nódulos en raíces de *Lablab purpureus* (L.) Sweet, 60 días después de la inoculación de *Rhizobium* sp. 5.

Autoría propia



Figura 21. Nódulos en raíces de *Lablab purpureus* (L.) Sweet, 60 días después de la inoculación de *Rhizobium* sp. 9.

Autoría propia



Figura 22. Nódulos en raíces de *Lablab purpureus* (L.) Sweet, 60 días después de la inoculación de *Rhizobium* sp. 7.

Autoría propia



Figura 23. Nódulos en raíces de *Lablab purpureus* (L.) Sweet, 60 días después de la inoculación de *Rhizobium* sp. 8.

Autoría propia



Figura 24. Nódulos radiculares pequeños, medianos y grandes formados por rizobios en *Lablab purpureus* (L.) Sweet.

Autoría propia

Tabla 13.

Número promedio de nódulos radiculares por planta de Lablab purpureus (L.) Sweet inoculada con rizobios

Tratamientos	Nódulos (N°)*			
	Pequeños	Medianos	Grandes	Total
<i>Rhizobium sp. 7</i>	12,62	13,37	1,87	27,86
<i>Rhizobium sp. 8</i>	3,62	12,50	4,62	20,74
<i>Rhizobium sp. 9</i>	2,12	12,87	1,25	16,24
<i>Rhizobium sp. 5</i>	0	6,00	2,25	8,25

*Promedio de ocho plantas

Autoría propia



Figura 25. Coloración característica de la parte interior de los nódulos formados por rizobios.

Autoría propia



Figura 26. Nódulos en raíces de *Lablab purpureus* (L.) Sweet inoculadas con *Rhizobium* sp. 7 en comparación con el testigo.

Autoría propia



Figura 27. Nódulos en raíces de *Lablab purpureus* (L.) Sweet inoculadas con *Rhizobium* sp. 5 en comparación con el testigo.

Autoría propia

Tabla 14.

Índices de efectividad de *Rhizobium* spp. en la altura y biomasa y número de nódulos radiculares de *Lablab purpureus* (L.) Sweet

Tratamientos	IE (%)						Número de nódulos	
	Altura/días					Biomasa/días	\bar{X}	
	10	20	30	40	50	60		
<i>Rhizobium</i> sp.7	47,29	24,42	14,34	7,70	7,97	12,34	33,06	27,86
<i>Rhizobium</i> sp.8	40,88	23,40	10,91	5,68	6,36	11,31	29,14	20,74
<i>Rhizobium</i> sp.9	35,96	15,77	7,99	3,73	3,95	5,63	22,76	16,24
<i>Rhizobium</i> sp.5	25,61	11,45	4,69	2,80	3,32	4,38	14,68	8,25

Autoría propia

V. DISCUSIÓN

El aislamiento de bacterias simbióticas a partir de nódulos radiculares de una fabácea coincide con Díaz y Delia (2010, p. 49) y Villanueva y Quintana (2012, p. 28) en *Phaseolus vulgaris* L. “frijol común”, Pérez et al. (2008, p. 151) en *Canavalia ensiformis* “canavalia”, *Stylosanthes guianensis* “stylo”, *Centrosema molle* “centrosema”, *Pueraria phaseloides* “kudzú” y *Macroptilium atropurpureum* “siratro” y Pérez et al. (2011, p. 71) en la fabácea *Teramnus volubilis* Sw “bejuco forrajera de chivo”.

El género *Phaseolus* incluye algunos de las fabáceas más “promiscuas” en lo que se refiere al elevado número de rizobios con los que establecen simbiosis efectivas. Esta capacidad de ser nodulados por una diversidad de bacterias se relaciona con la variedad de flavonoides exudados por las raíces y semillas (Díaz y Delia, 2010, p. 17), responsables de la respuesta codificada por los genes de nodulación de plásmidos del microsimbionte o genes nod (Hernández, et al, 2012, p. 52).

El ensayo de la cetolactasa evidenció la pureza de los rizobios, descartando las bacterias del género *Agrobacterium* (Sosa et al., 2004, p. 198). Al respecto, Sosa et al. (2004, p. 200) y Pérez et al. (2008, p. 155) destacaron la importancia de esta prueba bioquímica, debido a la similitud fenotípica entre estas bacterias. Los rizobios son capaces de establecer simbiosis con las fabáceas y agrupan a los géneros *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azorhizobium* y *Bradyrhizobium* entre otros (Díaz y Delia, 2010, p. 12). Estas bacterias no utilizan la lactosa, a diferencia de las especies de *Agrobacterium* que si la degradan, generando acidez, que origina el cambio de color del reactivo de Benedict (Sosa et al., 2004, p. 200). Las bacterias del género *Agrobacterium* son Gram negativas, aerobios, pero no fijan nitrógeno (Hernández et al., 2012, p. 52).

La formación de nódulos radiculares o infectividad en el cultivo de procedencia autenticó el 73% de los rizobios, porcentaje similar a 73,91% reportado por Díaz y Delia (2010, p 79) y mayor a 58% registrado por Carranza (2004, p. 33). El ensayo de inoculación *in vitro* permite verificar si el aislado bacteriano es un rizobio y si éste es efectivo en la nodulación

(Pérez et al., 2008, p. 1157). Las bacterias simbióticas fueron autenticadas como formadoras de nódulos radiculares, a los 42 días; no obstante, la nodulación se puede observar desde los 21 días en frijol común (Carranza, 2004, p. 29), 28 días en canavalia, stylo, centrosema, kudzu y siratro (Pérez et al., 2008, p. 154).

Los nódulos efectivos presentaron una coloración rojiza debido a la presencia de leghemoglobina, proteína que se combina con el oxígeno y lo transporta hasta la membrana de los simbioses, manteniendo en su interior una mínima concentración de oxígeno libre (10-50 nM). De esta manera, se mantiene la microaerofilia y se protege a la nitrogenasa muy sensible a la oxidación por el oxígeno (Díaz y Delia, 2010, p 5).

El 27% de los rizobios no demostraron infectividad. Al respecto, Pérez et al. (2008, p. 158) observaron que los rizobios aislados de canavalia fueron infectivos en “siratro”, pero no fueron capaces de nodular en condiciones de laboratorio a la fabácea de procedencia, resultado que es explicado por factores abióticos como la intensidad de la luz y humedad relativa que influyen en la fijación biológica. Por su parte, Díaz y Delia (2010, pp. 79-80) determinaron que el 26% de los rizobios investigados no re infectaron las plantas de frijol o produjeron una nodulación errática con aparición de nódulos en algunas de las plantas inoculadas, resultado que se atribuye a la población de bacterias inoculadas e influencia de factores ambientales o prácticas agronómicas.

La predominancia de los rizobios de crecimiento rápido frente a los de crecimiento lento, también se observó en bacterias aisladas de frijol común (Villanueva y Quintana, 2012, p. 24). La identificación de los rizobios se basa en un enfoque polifásico que además de las características morfológicas, bioquímicas y fisiológicas incluye la genética y filogenia; pero los estudios genéticos no se realizan previo a la identificación de las propiedades fenotípicas (Villanueva y Quintana, 2012, p. 26). Al respecto, Pérez et al. (2008, p. 156) aislaron rizobios de diversas fabáceas y con base a las diferencias morfológicas y fisiológicas observaron dos grupos. El primero que incluyó *Rhizobium* y *Sinorhizobium* agrupó bacterias de crecimiento rápido (2-3 días), colonias de 2-5mm, circulares, mucosas, blancas, y translúcidas o semitranslúcidas con excreción de sustancias ácidas.

El segundo grupo donde está *Bradyrhizobium* correspondió a bacterias de crecimiento lento (5-7 días), colonias de 1 mm, circulares, secas, cremosas o blancas, y granuladas o semitranslúcidas con excreción de sustancias básicas al medio. Estos investigadores concluyeron que el estudio morfológico y fisiológico de los rizobios no es definitorio para la clasificación taxonómica, pero si permite diferenciar géneros muy diferentes como *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* y *Sinorhizobium*.

Los rizobios demostraron efectividad al incrementar la altura y biomasa de las plantas de frijol, coincidiendo con Díaz y Delia (2010, p. 81), investigadores que reportaron 22% de efectividad en rizobios aislados de frijol. Los ensayos de infectividad y efectividad de los rizobios, evidenciada por la biomasa formada en el cultivo de procedencia (Díaz y Delia, 2010, pp 38-45) demostraron que las bacterias pueden constituir biofertilizantes de aplicación a escala comercial.

VI. CONCLUSIONES

6.1 En raíces de *Lablab purpureus* (L.) Sweet “frijol chileno” se aislaron bacterias simbióticas, entre las que 73% se autenticó con rizobios formadores de nódulos radiculares y se seleccionaron cuatro cultivos de *Rhizobium* spp.

6.2 Los cultivos de *Rhizobium* spp. seleccionados demostraron infectividad al formar 8 a 28 nódulos radiculares por plantas y efectividad al incrementar 2,80 a 47,29% la altura y 14,68 a 33,06% la biomasa de las plantas de chileno.

VII. RECOMENDACIONES

- Identificar a nivel molecular *Rhizobium* spp. 5, 7, 8 y 9.
- Determinar la efectividad de *Rhizobium* spp. en el rendimiento de las plantas de *Lablab purpureus* (L.) Sweet “frijol chileno” en condiciones de campo.
- Investigar sustratos para la obtención de un inoculante comercial de *Rhizobium* spp. 5, 7, 8 y 9.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alvitres, V. (2000). *Método Científico*. Lambayeque, Perú: Ed. Ciencia, Planificación de la Investigación.
- Baca, B., Soto, L., y Pardo, M. (2000). Fijación biológica de nitrógeno. *Elementos*, 38, 43-49.
- Carranza, C. (2004). *Aislamiento e identificación de cepas nativas de Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli, de frijol común (Phaseolus vulgaris) cultivados en los departamentos de Jutiapa y Chimaltenango*. (Tesis de Pregrado). Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Carreño, C. (2009). *Efecto de la inoculación de bacterias nativas solubilizadoras de fósforo en el desarrollo y rendimiento de tres cultivos agrícolas en Mochumí, Lambayeque, Perú*. (Tesis de Doctorado). Universidad Nacional de Trujillo, Perú.
- Díaz, A. y Delia, M. (2010). Leguminosas herbáceas para la preceba bovina en pastoreo: indicadores económicos y financieros. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 1 (44).
- Frioni, L. (2011). *Comunidades de diazótrofos asociados a maíz: efecto del genotipo de la planta y de la fertilización nitrogenada, en el departamento Biología Vegetal*. (Tesis de Doctorado). Universidad de la República, Uruguay.
- Garrido, R. (2007). *Aislamiento e identificación de bacterias diazotróficas rizosféricas y endófitas asociados a suelos y pastos del valle y sabana del Cesar en dos épocas climáticas*. (Tesis de Maestría). Universidad Militar Nueva Granada, Colombia.
- Hernández, J., Cubillos, J. y Milian, P. (2012). Aislamiento de cepas de *Rhizobium* spp., asociados a dos leguminosas forrajeras en el Centro Biotecnológico del Caribe. *Revista Colombiana de Microbiología Tropical*, 2(2), 51-62.
- Hernández, R., Fernández, C. y Baptista, P. (2014). *Metodología de la Investigación*. México: Mc Graw, Hill Interamericana Editores S.A.
- López, R., González, L. y Ramírez, R. (2000). Aislamiento y caracterización de cepas nativas de *Rhizobium* aisladas de leguminosas pratenses en suelos afectados por la salinidad. *Pastos y Forrajes*, 2(1), 1-5.
- Mendoza, J., y Bonilla, R. (2014). Infectividad y efectividad de rizobios aislados de suelos de la Costa Caribe colombiana en *Vigna unguiculata*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 16 (2), 84-89.
- Menezes, C. (2009). *Aislamiento y caracterización de bacterias diazotróficas asociadas a maíz (Zea mays) variedad PAU 871*. (Tesis de Pregrado). Universidad de la República, Uruguay.

- Municipalidad Distrital de Ciudad Eten, MDCE (2018). Coordenadas y Ciudades Cercanas. Recuperado de <http://wikimapia.org/18569656/es/Ciudad-Eten>
- Pedraza, R., Teixeira, K., Fernández A., García I., Baca, B., Azcón, R., Baldani V. y Bonilla R. (2010). Microorganismos que mejoran el crecimiento de las plantas y la calidad de los suelos. *Revista Corpoica: Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 11(2), 155-164.
- Pérez, G., Gómez G., Nápoles, M. y Morales B. (2008). Aislamiento y caracterización de cepas de rizobios aisladas de diferentes leguminosas en la región de Cascajal, Villa Clara. *Pastos y Forrajes*, 31(2), 151-159.
- Pérez, C., Grisales, T. y Fuentes, J. (2011). Determinación de morfotipos nativos de *Rhizobium* asociados a la leguminosa *Teramnus volubilis* Sw en fincas ganaderas del municipio de Tolú en el departamento de Sucre. *Revista Colombiana de Ciencia Animal*, 3(1), 62-89.
- Reyes, A., Ramírez, M. y Lozano, A. (2010). Caracterización de cepas de *Rhizobium* sp. que nodulan frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Recuperado de <http://natures.psu.ac.th/Link/SoilCongress/bdd/symp10/2205-t.pdf>.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, SAGARPA. (2010). Uso de Fertilizantes. Recuperado de <http://www.sagarpa.gob.mx/desarrollorural/documens/fichasaapt/uso%20de%20fertilizantes>.
- Silva, L. y Zúñiga, G. (2018). *Bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas de Asparagus officinalis L. y su efecto en el desarrollo vegetativo de Lycopersicon esculentum Mill. "tomate"*. (Tesis de pregrado). Universidad Nacional de Pedro Ruiz Gallo, Perú.
- Sosa, A., Elías, A., García O. y Sarmiento, M. (2004). Aislamiento y caracterización fenotípica parcial de cepas de rizobios que nodulan leguminosas rastreras. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 38(2), 197-201.
- Villanueva E., y Quintana A. (2012). Aislamiento y selección de bacterias nativas de rizobios fijadores de nitrógeno, a partir de nódulos radiculares de *Phaseolus vulgaris*. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Biológicas*, 32(1), 24-30.
- Zúñiga, D. (2008). *Manual de Microbiología Agrícola: Rhizobium, PGPR, indicadores de fertilidad e inocuidad*, Perú: Universidad Nacional Agraria de la Molina.

ANEXOS

ANEXO 1

Cálculo del número de muestras de nódulos radiculares (en Alvitres, 2000).

$$n = \frac{z^2(p \cdot q)}{t^2}$$

Donde:

n = Tamaño de muestra

z = 1,96 ($\alpha=0,05$), valor estándar

p = Prevalencia de *Rhizobium* spp.

q = Ausencia (0,10)

t = Error permitido (8%)

$$n = \frac{(1,96)^2(0,90 \cdot 0,10)}{(0,08)^2}$$

$$n = 54,02 \text{ muestras}$$

ANEXO 2

Medios de cultivo para el aislamiento, identificación y mantenimiento de cepas de *Rhizobium* sp. (en Zúñiga, 2008).

a. Caldo Manitol-Levadura:

Manitol	10,0 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ *7H ₂ O	0,2 g
NaCl	0,1 g
Extracto de levadura	0,5 g
Agua destilada	1,0 litro

Ajustar el pH a 7 y Autoclavar a 121 grados Celsius.

b. Agar Manitol-Levadura:

Caldo manitol-levadura	1 litro
Agar	15 g
Azul de bromotimol	5 mL

c. Colorante azul de bromotimol

Solución Stock: 0,5 g/100 mL etanol

Agregar 5 mL de la solución Stock por litro de agar manitol levadura.

ANEXO 3

Análisis del suelo



Instituto Nacional de Innovación Agraria
Estación Experimental Vista Florida - Chiclayo

LABORATORIO DE ANALISIS : AGUAS Y SUELOS

Tipo de Análisis	Fertilidad	Muestras	Suelos- 1
Nombre	SR. ABEL ALFONSO ANGELES CUMPA	Cultivo	
	SR. J. FRANCISCO TESEN VILLANUEVA		
Procedencia	CIUDAD ETEN	Fecha Emisión	8/11/2018

Muestras	Extracto saturado		M.O %	P ppm	K ppm	Calcar. %	Texturas (%)			Tipo suelo
	pH	C. elec mhos/cm					Ao.	Lo	Ar	
M-1	7.20	2.52	0.47	6.50	274	2.67	73	10	17	Fo Ao
<p>Resultado :reacción ligeramente alcalina ,cuyo valor de p H es apropiado para la disponibilidad de nutrientes y el nivel de salinidad es bajo , cuyo valor permiten el manejo de cultivos sensibles como leguminosas y ajíes y semitolerantes como híbridos de maíz, camotes, yuca etc</p> <p>La fertilidad natural baja, con deficiencias de nitrógeno, fósforo, potasio, y bajo tenor de materia orgánica, fortalecer las deficiencias con fertilización compuesta por vía suelo y foliar . La textura es franco arenosa de ligera retención de humedad,mejorarla con incorporación de materia orgánica .</p>										


ING. DANTE BOLIVAR DIAZ
 Jefe Laboratorio de Química y Suelos
 Jefe Lab. de Química y Suelos

ANEXO 4

Temperaturas mínima, media y máxima durante el cultivo de *Lablab purpureus* (L.) Sweet.

Fecha	Temperatura mínima (°C)	Temperatura media (°C)	Temperatura máxima (°C)
10/02/2018	24	27	31
11/02/2018	24	25	31
12/02/2018	24	25	32
13/02/2018	24	27	31
14/02/2018	24	27	29
15/02/2018	24	26	31
16/02/2018	25	27	31
17/02/2018	25	27	34
18/02/2018	25	27	32
19/02/2018	24	27	32
20/02/2018	25	27	31
21/02/2018	24	26	31
22/02/2018	24	27	32
23/02/2018	25	29	31
24/02/2018	21	26	31
25/02/2018	23	25	29
26/02/2018	16	21	24
27/02/2018	16	21	23
28/02/2018	16	22	24
01/03/2018	16	21	23
02/03/2018	27	27	33
03/03/2018	24	25	32

Continuación...

Fecha	Temperatura mínima (°C)	Temperatura media (°C)	Temperatura máxima (°C)
04/03/2018	24	26	32
05/03/2018	24	23	31
06/03/2018	24	25	32
07/03/2018	24	27	31
08/03/2018	23	24	32
09/03/2018	24	25	32
10/03/2018	24	26	32
11/03/2018	24	23	31
12/03/2018	24	25	32
13/03/2018	24	27	31
14/03/2018	23	24	32
15/03/2018	23	25	31
16/03/2018	23	25	30
17/03/2018	24	27	31
18/03/2018	24	25	31
19/03/2018	24	25	32
20/03/2018	24	27	31
21/03/2018	24	27	29
22/03/2018	24	26	31
23/03/2018	25	27	31
24/03/2018	25	27	34
25/03/2018	25	27	32
26/03/2018	24	27	32
27/03/2018	25	27	31

Continuación...

Fecha	Temperatura mínima (°C)	Temperatura media (°C)	Temperatura máxima (°C)
28/03/2018	24	26	31
29/03/2018	24	27	32
30/03/2018	25	29	31
31/03/2018	21	26	31
01/04/2018	23	25	29
02/04/2018	23	26	30
03/04/2018	22	25	30
04/04/2018	22	25	30
05/04/2018	20	24	30
06/04/2018	22	24	28
07/04/2018	21	24	30
08/04/2018	21	26	31
09/04/2018	23	25	30
10/04/2018	20	25	30
11/04/2018	23	25	30
12/04/2018	23	26	31
13/04/2018	22	25	30
14/04/2018	22	26	30
15/04/2018	21	27	39
16/04/2018	21	25	28
17/04/2018	21	25	30
18/04/2018	21	26	28
19/04/2018	22	26	30
20/04/2018	22	26	30

Continuación...

Fecha	Temperatura mínima (°C)	Temperatura media (°C)	Temperatura máxima (°C)
21/04/2018	21	25	30
22/04/2018	21	26	29
23/04/2018	21	25	30
24/04/2018	21	24	29
25/04/2018	19	24	27
26/04/2018	20	24	27
27/04/2018	20	25	28
28/04/2018	21	24	28
29/04/2018	20	24	26
30/04/2018	21	25	27
01/05/2018	20	25	27
02/05/2018	20	25	27
03/05/2018	20	25	28
04/05/2018	20	25	27
05/05/2018	18	23	27
06/05/2018	19	23	25
07/05/2018	20	26	27
08/05/2018	20	24	26
09/05/2018	20	24	26
10/05/2018	19	24	26
11/05/2018	20	23	25
12/05/2018	20	23	25
13/05/2018	20	23	26
14/05/2018	19	24	26

Continuación...

Fecha	Temperatura mínima (°C)	Temperatura media (°C)	Temperatura máxima (°C)
15/05/2018	17	23	25
16/05/2018	18	23	25
17/05/2018	19	23	25
18/05/2018	19	24	27
19/05/2018	19	24	27
20/05/2018	16	23	26
21/05/2018	18	23	25
22/05/2018	18	23	25
23/05/2018	19	22	24
24/05/2018	18	23	25
25/05/2018	17	23	26
26/05/2018	18	23	25
27/05/2018	18	23	25
28/05/2018	19	22	24
29/05/2018	18	21	23
30/05/2018	19	21	22
31/05/2018	17	23	26
01/06/2018	19	23	26
02/06/2018	18	23	25
03/06/2018	19	21	24
04/06/2018	18	20	23
05/06/2018	18	22	24
06/06/2018	19	23	25
07/06/2018	18	20	21

Continuación...

Fecha	Temperatura mínima (°C)	Temperatura media (°C)	Temperatura máxima (°C)
08/06/2018	18	21	24
09/06/2018	18	20	23
10/06/2018	18	21	24
11/06/2018	18	21	24
12/06/2018	17	22	24
13/06/2018	17	23	25
14/06/2018	16	23	25
15/06/2018	17	21	22
16/06/2018	18	21	24
17/06/2018	17	22	24
18/06/2018	17	19	21
19/06/2018	17	22	24
20/06/2018	17	22	24
21/06/2018	18	20	21
22/06/2018	18	20	21
23/06/2018	19	21	22
24/06/2018	17	20	22
25/06/2018	17	21	24
26/06/2018	17	21	24
27/06/2018	16	21	24
28/06/2018	17	22	24
29/06/2018	15	21	24
30/06/2018	17	22	24
01/07/2018	17	21	23

Continuación...

Fecha	Temperatura mínima (°C)	Temperatura media (°C)	Temperatura máxima (°C)
02/07/2018	18	21	24
03/07/2018	17	22	24
04/07/2018	17	21	22
05/07/2018	17	19	21
06/07/2018	18	21	24
07/07/2018	16	21	24
08/07/2018	16	20	23
09/07/2018	17	20	23
10/07/2018	17	21	24
11/07/2018	17	21	24
12/07/2018	22	26	30
13/07/2018	18	21	24
14/07/2018	17	21	24
15/07/2018	17	19	20
16/07/2018	17	20	22
17/07/2018	17	21	23
18/07/2018	16	21	23
19/07/2018	16	20	21
20/07/2018	16	21	23
21/07/2018	17	22	24
22/07/2018	18	22	25
23/07/2018	17	21	24
24/07/2018	16	22	24
25/07/2018	16	18	22

Continuación...

Fecha	Temperatura mínima (°C)	Temperatura media (°C)	Temperatura máxima (°C)
26/07/2018	17	19	22
27/07/2018	16	20	23
28/07/2018	16	21	23
29/07/2018	16	21	22
30/07/2018	16	20	21
31/07/2018	16	21	23
01/08/2018	16	20	21
02/08/2018	17	20	21
03/08/2018	17	22	24
04/08/2018	17	20	21
05/08/2018	17	21	23
06/08/2018	17	21	23
07/08/2018	17	22	24
08/08/2018	16	21	23
09/08/2018	16	21	23
10/08/2018	16	21	24
11/08/2018	16	20	23
12/08/2018	16	22	24
13/08/2018	16	21	23
14/08/2018	16	22	24
15/08/2018	16	22	24
16/08/2018	16	21	23
17/08/2018	16	21	23
18/08/2018	16	21	23

Continuación...

Fecha	Temperatura mínima (°C)	Temperatura media (°C)	Temperatura máxima (°C)
19/08/2018	16	22	24
20/08/2018	17	22	24
21/08/2018	17	22	24
22/08/2018	16	21	23
23/08/2018	17	22	23
24/08/2018	16	21	23
25/08/2018	16	21	23
26/08/2018	16	22	24
27/08/2018	16	20	23
28/08/2018	16	20	23
29/08/2018	16	21	24
30/08/2018	16	23	25
31/08/2018	16	21	23
01/09/2018	16	18	20
02/09/2018	15	18	22
03/09/2018	15	18	22
04/09/2018	16	19	22
05/09/2018	16	21	23
06/09/2018	24	27	31
07/09/2018	24	25	31
08/09/2018	24	25	32
09/09/2018	24	27	31
10/09/2018	24	27	29
11/09/2018	24	26	31

Continuación...

Fecha	Temperatura mínima (°C)	Temperatura media (°C)	Temperatura máxima (°C)
12/09/2018	25	27	31
13/09/2018	25	27	34
14/09/2018	25	27	32
15/09/2018	24	27	32
16/09/2018	25	27	31
17/09/2018	24	26	31
18/09/2018	24	27	32
19/09/2018	25	29	31
20/09/2018	21	26	31
21/09/2018	23	25	29
22/09/2018	16	21	24
23/09/2018	16	21	23
24/09/2018	16	22	24

ANEXO 5

a. Prueba de normalidad de los valores de altura de *Lablab purpureus* (L.) Sweet a los 10 días

Pruebas de normalidad						
Tratamientos	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Testigo	,172	8	,200*	,909	8	,348
<i>Rhizobium</i> 5	,220	8	,200*	,917	8	,408
<i>Rhizobium</i> 9	,209	8	,200*	,959	8	,797
<i>Rhizobium</i> 7	,167	8	,200*	,957	8	,778
<i>Rhizobium</i> 8	,137	8	,200*	,970	8	,898

*.Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de significación de Lilliefors

Prueba de homogeneidad de varianzas

Prueba de homogeneidad de varianzas				
Estadístico de Levene	gl1		gl2	Sig.
3,122	4		35	,027

Análisis de varianza

ANOVA					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	448,144	4	112,036	718,179	,000
Dentro de grupos	5,460	35	,156		
Total	453,604	39			

b. Prueba de normalidad de los valores de altura de *Lablab purpureus* (L.)

Sweet a los 20 días

Pruebas de normalidad						
Tratamientos	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	Gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Testigo	,146	8	,200*	,977	8	,945
<i>Rhizobium</i> 5	,170	8	,200*	,958	8	,796
<i>Rhizobium</i> 9	,160	8	,200*	,947	8	,678
<i>Rhizobium</i> 7	,146	8	,200*	,978	8	,952
<i>Rhizobium</i> 8	,181	8	,200*	,929	8	,504

*.Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de significación de Lilliefors

Prueba de homogeneidad de varianzas

Prueba de homogeneidad de varianzas				
Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.	
,615	4	35	,655	

Análisis de varianza

ANOVA					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	486,660	4	121,665	368,243	,000
Dentro de grupos	11,564	35	,330		
Total	498,224	39			

c. Prueba de normalidad de los valores de altura de *Lablab purpureus* (L.) Sweet a los 30 días

Pruebas de normalidad						
Tratamientos	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Testigo	,137	8	,200*	,968	8	,879
<i>Rhizobium</i> 5	,169	8	,200*	,925	8	,475
<i>Rhizobium</i> 9	,157	8	,200*	,922	8	,448
<i>Rhizobium</i> 7	,191	8	,200*	,882	8	,197
<i>Rhizobium</i> 8	,145	8	,200*	,954	8	,747

*.Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de significación de Lilliefors

Prueba de homogeneidad de varianzas

Prueba de homogeneidad de varianzas				
Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.	
1,428	4	35	,245	

Análisis de varianza

ANOVA					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	608,443	4	152,108	415,555	,000
Dentro de grupos	12,811	35	,366		
Total	621,244	39			

d. Prueba de normalidad de los valores de altura de *Lablab purpureus* (L.) Sweet a los 40 días

Pruebas de normalidad						
Tratamientos	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	Gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Testigo	,188	8	,200*	,923	8	,452
<i>Rhizobium</i> 5	,170	8	,200*	,957	8	,778
<i>Rhizobium</i> 9	,165	8	,200*	,907	8	,335
<i>Rhizobium</i> 7	,162	8	,200*	,913	8	,378
<i>Rhizobium</i> 8	,275	8	,076*	,911	8	,364

*.Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de significación de Lilliefors

Prueba de homogeneidad de varianzas

Prueba de homogeneidad de varianzas				
Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.	
2,202	4	35	,089	

Análisis de varianza

ANOVA					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	447,911	4	111,978	396,382	,000
Dentro de grupos	9,887	35	,282		
Total	457,799	39			

e. Prueba de normalidad de los valores de altura de *Lablab purpureus* (L.) Sweet a los 50 días

Pruebas de normalidad						
Tratamientos	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Testigo	,206	8	,200*	,865	8	,134
<i>Rhizobium</i> 5	,224	8	,200*	,904	8	,313
<i>Rhizobium</i> 9	,187	8	,200*	,944	8	,650
<i>Rhizobium</i> 7	,125	8	,200*	,993	8	,998
<i>Rhizobium</i> 8	,154	8	,200*	,957	8	,778

*.Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de significación de Lilliefors

Prueba de homogeneidad de varianzas

Prueba de homogeneidad de varianzas				
Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.	
,772	4	35	,551	

Análisis de varianza

ANOVA					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	908,423	4	227,106	1248,324	,000
Dentro de grupos	6,367	35	,182		
Total	914,791	39			

f. Prueba de normalidad de los valores de altura de *Lablab purpureus* (L.) Sweet a los 60 días

Pruebas de normalidad						
Tratamientos	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	Gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Testigo	,213	8	,200*	,926	8	,480
<i>Rhizobium</i> 5	,179	8	,200*	,966	8	,863
<i>Rhizobium</i> 9	,192	8	,200*	,933	8	,541
<i>Rhizobium</i> 7	,234	8	,200*	,888	8	,226
<i>Rhizobium</i> 8	,181	8	,200*	,879	8	,184

*.Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de significación de Lilliefors

Prueba de homogeneidad de varianzas

Prueba de homogeneidad de varianzas				
Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.	
1,181	4	35	,336	

Análisis de varianza

ANOVA					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	2865,703	4	716,426	2602,144	,000
Dentro de grupos	9,636	35	,275		
Total	2875,340	39			

g. Prueba de normalidad de los valores de biomasa de *Lablab purpureus* (L.) Sweet a los 60 días

Pruebas de normalidad						
Tratamientos	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Testigo	,170	4	.	,995	4	,980
<i>Rhizobium</i> 5	,203	4	.	,980	4	,899
<i>Rhizobium</i> 9	,215	4	.	,946	4	,689
<i>Rhizobium</i> 7	,191	4	.	,979	4	,894
<i>Rhizobium</i> 8	,192	4	.	,971	4	,850

a. Corrección de significación de Lilliefors

Prueba de homogeneidad de varianzas

Prueba de homogeneidad de varianzas				
Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.	
,295	4	15	,876	

Análisis de varianzas

ANOVA					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	152,608	4	38,152	260,423	,000
Dentro de grupos	2,198	15	,147		
Total	154,805	19			